CARACTERIZACIÓN DE LA DEFICIENCIA NUTRICIONAL DE CINC Y BORO EN PLÁNTULAS DE TABACO NEGRO

Lisette Monzón Herrera[1] y Völker Romheld[2]
[1]Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera Tumbadero km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana. Cuba.
E-mail: lisette@iitabaco.co.cu
[2]Instituto de Nutrición en Plantas, Universidad de Hohenheim, Alemania.

RESUMEN

Los síntomas visuales de deficiencias de nutrientes, que se inician con microsíntomas, son la expresión externa de numerosos procesos metabólicos, en los cuales el elemento participa. Las investigaciones relacionadas con los micronutrientes son muy frecuentes en la comunidad científica internacional, fundamentalmente, las del boro. En este trabajo se pretende establecer los valores que definen deficiencias nutricionales de cinc y boro para el tabaco negro cubano. Se desarrolló un experimento en soluciones nutritivas para generar sus deficiencias. Se ilustraron los síntomas característicos y se establecieron los límites de concentraciones. Se observan signos de deficiencia en cinc < 30 µg Zn g^{-1} y para el boro < 20 µg B g^{-1}MS en hojas adultas. Se demuestra que el rango de valores críticos de deficiencia en tabaco negro, es diferente a lo reportado en la literatura para otros tipos de tabaco.
***Palabras claves**: deficiencias, cinc, boro, tabaco*

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF ZINC AND BORON NUTRITIONAL DEFICIENCY IN BLACK TOBACCO SEEDLINGS

The visual symptoms for nutrients deficiencies, which begin with several microsymptoms, are the external expression of a group of metabolic pathways in which the nutrient take part. Actually there are many investigations around the world relative to micronutrients specially the ones referred to Boron. The present experiment was done, in order to establish the concentrations that define visual symptoms of deficiencies for the Cuban Black tobacco. An experiment in nutrient solution was design to generate the deficiencies. Finally the characteristic symptoms were shown as well as the concentration ranges. There were visual signals for zinc deficiency < 30 µg Zn g^{-1} and for boron < 20 µg B g^{-1}MS. The ranges of critical values for the nutrients, in black tobacco are different to the reported in the literature for the rest of tobacco types.
***Key words**: nutritional deficiency, zinc, boron, tobacco*

INTRODUCCIÓN

Los síntomas visuales de deficiencias de nutrientes, que se inician con microsíntomas, son la expresión externa de numerosos procesos metabólicos, en los cuales el elemento participa.

El diagnóstico visual solo brinda información retrospectiva relacionada con el suministro de nutrientes, aunque una vez que los síntomas han sido identificados, las causas pueden ser esclarecidas mediante análisis más detallados, entre los que se incluyen el análisis de suelo y planta. Por tal motivo, se pueden definir las estrategias para remediar el desbalance (Bergmann, 1992).

Las investigaciones relacionadas con los micronutrientes son muy comunes en la comunidad científica internacional, en especial, las del boro, lo que está determinado, fundamentalmente, después de haberse demostrado su importancia para la agricultura y la utilización de métodos analíticos mucho más confiables para su determinación.

El tabaco requiere de poca cantidad de boro, aunque el rango entre los límites críticos es muy estrecho y en exceso llega a ser fitotóxico (Callins y Hawks, 1993, citados por Layten y Nielsen, 1999). Además, se conoce que la deficiencia de cinc esta ampliamente distribuida en suelos ácidos y calcáreos (Marschner, 1995), precisamente los que se emplean en el cultivo del tabaco.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer los valores que para tabaco negro, definen deficiencias nutricionales de cinc y boro, a partir de nuestros niveles críticos e imágenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de las plántulas

Las semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv 'Criollo-98)' germinaron en una mezcla de 50% de sustrato de Turba TKS tipo1 (fino) (Gütezeichen Kultursubstrate Floragard Product, Alemania) y 50% de arena de cuarzo (Kristall-Quarzsand 0,3-0,8mm, Alemania).

Las plantas crecieron en una cámara climática bajo condiciones controladas con un fotoperíodo de 14 h de luz, con intensidad de 370 µmol/m²s, temperatura entre 25-20 ºC día/noche y la humedad relativa al 60%. Después de 20 días de sembradas, las plántulas se transfirieron a potes de 0,5 L con solución nutritiva completa: 0,5 M $Ca(NO3)_2$; 0,1 M KH_2PO_4; 0,5 M K_2SO_4; 0,5 M $MgCl_2$; 10 µM H_3BO_3; 0,5 µM $MnSO_4$; 0,5 µM $ZnSO_4$; 0,2 µM $CuSO_4$; 0,1 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, y 0,15M Fe-EDTA.

Para evitar el daño radical, el Fe-EDTA se añadió a la solución 3 días más tarde. Después de 10 días, las plantulitas se colocaron en las soluciones deficientes de cada elemento, las cuales constituyeron los tratamientos. Se diseñaron tres tratamientos: uno de deficiencia de boro, otro de cinc y el control. Cada tratamiento contó con dos plantas por potes, que se replicaron tres veces. El recambio del medio nutricio se realizó cada dos días.

Con la presencia de los primeros síntomas se muestrearon dos hojas viejas (base) y dos hojas jóvenes (ápice). El muestreo se realizó luego de que aparecieran los primeros síntomas y a partir de éste, cada tercer día por tres ocasiones. La última muestra incluyó raíces, tallos y hojas centrales. Cada día de muestreo se tomaron fotos. Las muestras se secaron en horno de aire forzado a 60º C por 24 h y después se molinaron. El resultado de los análisis químicos (boro, cinc) se expresó siempre en función de la masa seca.

Determinación de cinc

Se tomó una muestra 0,1 g de material seco molinado y se incineró a 500 °C durante 4 h. Después se humedeció con gotas de

H_2O_2 al 3%, se secó en plato caliente y se retornó nuevamente a la mufla por 1 h. Las cenizas se aclararon de SiO_2 con gotas de agua deionizada y 2 mL HNO_3 1:3 Se añadieron 2 mL de HCl 1:3 y se transfirió a volumétricos de 20 mL. La solución final se hirvió. El Zn se determinó en espectrofotómetro de absorción atómica (Unicam AAS 939, Kassel, Alemania).

Determinación de boro

Entre 0,1- 0,3 g de material seco molinado, se incineró a 200 ºC por 1 h, a 300 ºC por 1 h, a 400 ºC por 1 h y a 500 ºC por 3 h, y se dejó reposar toda la noche. En caso de que las cenizas no estuvieran grises, se humedecieron con gotas de H_2O_2 al 3%, se secó y se colocó nuevamente a 500 °C por 3 h. Se refrescó y se añadieron 5 mL de HNO_3 1:30. Una hora más tarde se transfirió a frascos plásticos y se centrifugó. Para la medición en ICP-MS (Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo), se añadieron 10 ppb Rh como estándar interno

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinc

En las plantas deficientes se redujo la expansión foliar, se ondularon los bordes en las hojas más jóvenes y se acortaron los entrenudos, lo que concuerda con lo descrito por Römheld y Marschner (1991) para las dicotiledóneas. Las hojas centrales mostraron clorosis con algunos puntos necróticos (Fig. 1). En la literatura estos puntos están descritos como un efecto secundario causado por toxicidad del fósforo y del boro o debido a estrés fotooxidativo (Marschner, 1995).

En las plantas controles, los niveles estuvieron entre 25-82 µg Zn g^{-1} MS. Las hojas adultas mostraron valores mayores que las jóvenes. La curva de concentración de este elemento en función del tiempo, mostró una caída drástica luego de 28 DDT.

La concentración de cinc en las plantas deficientes estuvo entre 20-30 µg Zn g^{-1} MS. En las hojas jóvenes de plantas deficientes, los niveles de cinc fueron casi la mitad de lo encontrado en las plantas controles. Sin embargo, se alcanzaron valores muy bajos después de 31 días en solución nutritiva deficiente (Fig. 2).

Fig. 1. Síntomas visuales de deficiencia de Zn

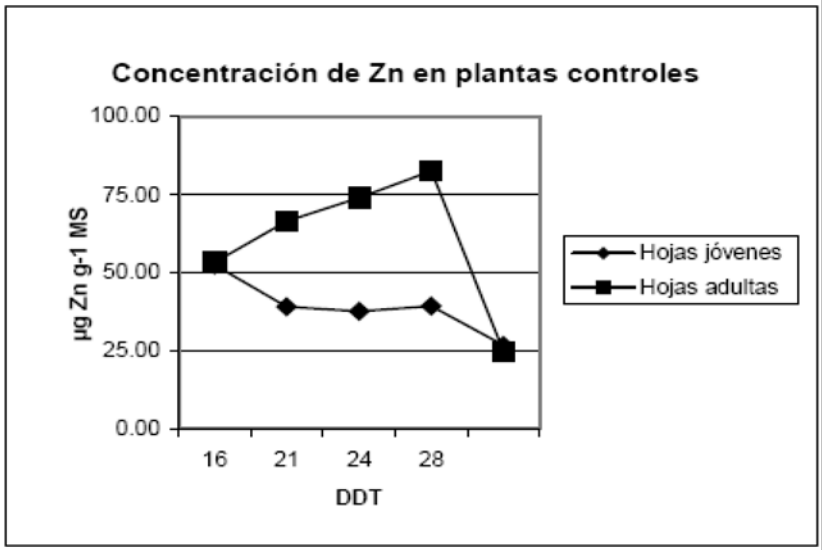


Fig. 2. Curso temporal del cinc en las plántulas de tabaco negro en solución completa.

Las plantas controles se comportaron dentro de lo descrito como normal por Bergmann (1992) en tabaco Virginia. Su propuesta de valores estuvo entre 25-70 µg Zn g^{-1} MS.
Los síntomas de deficiencia visual se presentaron con valores superiores a los descritos por Marschner (1995) como valores críticos (15-20 µg Zn g^{-1} MS).
Los mayores valores en las hojas adultas del estudio y la caída de la curva de concentración concuerdan con lo descrito por Robson (1993) para plantas saludables con elevado suplemento de Zn y en hojas senescentes, respectivamente.

Boro

El tratamiento de ausencia de Boro fue el segundo en mostrar signos visuales, 7 días se transfirieron a la solución deficiente, probablemente debido a que estas plantas estaban en un estadio de crecimiento vegetativo activo. Los primeros síntomas de deficiencia se mostraron en las hojas jóvenes, las cuales tomaron una coloración verde intensa y se necrosaron en la base. El resto de las hojas se expandieron mucho más y, finalmente, la yema terminal murió (Figura 3).

Fig. 3. Inhibición del crecimiento longitudinal por la deficiencia de Boro. a) Muerte de la yema apical.

Estos síntomas concuerdan con los relatados por Umesh (1993) para tabaco, que se apoya en el criterio de inmovilidad de este elemento. El único síntoma que no se observó fue la clorosis intervenal que él describe.

En las plantas deficientes el crecimiento longitudinal se inhibe como resultado del daño de las regiones meristemáticas. Esta característica de la deficiencia del boro y su acción inhibitoria sobre los tejidos es precisamente uno de los atributos que hace que el boro sea un elemento importante para la agricultura (Brown *et al*., 2002). Entre las hipótesis descritas para justificar esta acción inhibitoria sobre el crecimiento están: la respuesta rápida del mecanismo de síntesis de la pared celular y del metabolismo fenólico a la carencia de boro, la disminución de la concentración de ácidos nucleicos y otras (Römheld y Marschner, 1991).

Los niveles de boro en los controles estuvieron entre 25-36 µg B g^{-1}MS en hojas adultas y alrededor de 16 µg B g^{-1}MS en las jóvenes. En condiciones de deficiencia las concentraciones disminuyeron drásticamente hasta 19 y 15 µg B g^{-1}MS.

En las hojas jóvenes, los valores estuvieron alrededor de 6 µg B g^{-1}MS. En el caso de deficiencia extrema luego de 6 días de omisión de boro, se redujo hasta 2 µg B g^{-1}MS. Bergmann (1992) reporta valores normales entre 30-80 p.p.m. en hojas maduras de tabaco 'Virginia' y en una tabla general para diferentes especies de plantas, señala para *Nicotiana tabacum* L. 25 µg B g^{-1}MS. En la literatura consultada no se encuentran valores críticos específicos para tabaco.

CONCLUSIONES

• Los síntomas visuales de deficiencia de cinc se observan con valores en hojas adultas menores 30 µg Zn g^{-1} MS

• En la deficiencia de boro se manifiestan los síntomas, cuando los valores en las hojas adultas están por debajo de 20 µg B g^{-} MS.

• El rango de valores críticos, para los cuales se observan signos de deficiencia en tabaco negro, es diferente a lo reportado en la literatura para otros tipos de tabaco.

BIBLIOGRAFÍA

Bergmann, W.: *Nutritional disorders of plants: Development, visual and analytical diagnosis,* Gustav Fisher Verlag Jena-Stuttgart-New York, 1992.

Brown, P.H., N. Bellaloui, M. A. Wimmer *et al.:* Boron in Plant Biology. *Plant. Biol.,* 4:205-223, 2002.

Layten, D. and M. T. Nielsen: *Tobacco: Production, Chemistry and Technology,* 467 pp., Blackwell Science, USA. 1999.

Marschner, H.: *Mineral Nutrition of higher plants,* 2nd ed., UK: Academic Press Limited, London, 1995.

Robson, A. D.: Zinc in soils and Plants. In *Development in plant and Soil Science,* vol. 55, 205 pp., Kluwer Academic Publishers Australia, 1993.

Römheld, V. and H. Marschner: Chapter 9: Functions of micronutrients in plants. In *Micronutrients in Agriculture,* 2nd ed., pp. 297-328, Soil Science Society of America, USA, 1991.

Umesh, C.: *Boron and its role in crop production,* pp, 148-151, CRC Press Inc., USA, 1993.

LA CLOROFILA FOLIAR COMO CRITERIO PARA RECOLECTAR EL TABACO NEGRO NICOTIANA TABACUM *L. VAR. 'COROJO-99´ CULTIVADA BAJO TELA*

Lic. Amaury Borges Miranda[1], MSc. Alejandro Izquierdo Medina[1], MSc. Betty Hernández García[1]. MSc. Yarilis León Gonzáles[1]
Estación Experimental del Tabaco, San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba.
E-mail: amaury.borges@iitabaco.co.cu

RESUMEN.

La recolección del tabaco negro se realiza principalmente mediante apreciación visual, por el cambio de coloración que experimentan las hojas al llegar a la madurez técnica. Sería muy útil contar con un método más científico para efectuar esta labor, donde se minimice la subjetividad de esta valoración. Se realizó un experimento en la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez durante el período 2002-2004, con el objetivo de definir el momento óptimo para recolectar, mediante la utilización del contenido de clorofila foliar y su correlación con el rendimiento y la calidad del tabaco producido. Se estudió la recolección en siete momentos: 38; 41; 44; 47; 50; 53 y 56 días posteriores al trasplante. El mayor contenido de clorofila foliar fue de 39,5 SPAD en el día 50 y disminuye significativamente con el retraso en la recolección. El mayor rendimiento total y en capas de exportación superior se obtuvo con el inicio de la recolección a los 53 días. La hoja se debe recolectar cuando el nivel de clorofila sea de 39 SPAD o más, no debe disminuir de este valor.

Palabras claves: *clorofila, SPAD, madurez técnica, recolección, capas, rendimiento, tabaco.*

ABSTRACT

LEAF CHLOROPHYLL AS A GUIDE FOR HARVESTING SHADE GROWN BLACK TOBACCO NICOTIANA TABACUM *L. VAR. 'COROJO-99´*

Harvesting of black tobacco is carried out mainly by means of visual appreciation, for the change of coloration that experience leaves when reaching ripeness. It would be very useful to have a more scientific method to make this work, where the subjectivity of this valuation is minimized. In order to determine the optimal time for harvesting leaves, using the chlorophyll content of the leaves and their correlation with yield and quality of tobaco product was carried out an experiment at the Tobacco Experimental Station in San Juan y Martínez during the period 2002-2004. The harvest was studied in seven moments: 38; 41; 44; 47; 50; 53 and 56 days after transplant. The results indicated that the highest chlorophyll content of the leaves was of 39,5 SPAD in the day 50 and it diminishes significantly with the delayed harvesting. The highest total yield and wrapper leaves yield for cigar manufacturing for export was obtained with the begining of harvesting at 53 days. The leaf should be harvested when the chlorophyll level is of 39 SPAD or more, it should not diminish of this value.

Key words: *chlorophyll, SPAD, ripeness, harvesting, wrappers, yield, tobacco.*

INTRODUCCIÓN

Después de la fertilización, el momento de cosecha es probablemente la práctica cultural más importante para producir buen tabaco (Tso, 1999). La madurez técnica es el estado fisiológico requerido antes de recolectar la hoja y curarla para conseguir el producto final deseado; representa un momento de senescencia temprana (Akehurst, 1973).

La recolección del tabaco negro cubano se efectúa tradicionalmente según la apreciación visual del productor, pues las variedades marcan su punto de madurez técnica con un ligero cambio de coloración (Monzón, 2003). Este criterio es seguido por la mayoría de las investigaciones realizadas en Cuba (Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, Flower (1999) precisa que una recomendación basada en días después del transplante, no es un buen criterio por las variaciones climáticas que pueden ocurrir en las estaciones de plantación de un año a otro.

El medidor de clorofila SPAD 502 (MINOLTA; Spectrum Technologies Inc.), proporciona, de manera rápida y repetible, un valor digital conocido como valor SPAD, que es la razón entre la densidad óptica del pico de absorbancia de la clorofila medido a 650 nm y la absorbancia no asociada a la clorofila medida a 940 nm. Estos valores permiten conocer el contenido de clorofila de la hoja y son un índice del verdor foliar (Mac Kown *et al.,* 1998; Lawlor, 2002).

El tabaco negro, específicamente, el destinado a la producción de capas, recibe una gran cantidad de fertilizante nitrogenado para elevar su contenido de nicotina. Se recolecta cuando su contenido de nitrógeno y clorofila son más altos que los demás tipos de tabaco (Akehurst, 1973), lo que hace poco evidente el cambio de coloración y dificulta observar el mejor momento para recolectar. Por tal motivo, sería útil disponer de un criterio más científico y menos subjetivo.

El objetivo de este trabajo fue definir el momento óptimo de la recolección teniendo en cuenta el contenido de clorofila foliar, así como analizar su correlación con el rendimiento y la calidad del tabaco producido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El experimento se realizó en la Estación Experimental del Tabaco de San Juan y Martínez, provincia de Pinar del Río, en un suelo Ferralítico Amarillento Lixiviado (Hernández *et al.,* 1999), durante las cosechas tabacaleras 2002-2003 y 2003-2004. La variedad utilizada fue la 'Corojo-99´ cultivada bajo tela.

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño de bloques al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos consistieron en el comienzo de la recolección a los 38; 41; 44; 47; 50; 53 y 56 días del trasplante. El resto de las labores fitotécnicas del cultivo y el intervalo de cosecha entre los niveles foliares, se realizaron según lo recomendado por el *Manual técnico para el cultivo del tabaco negro tapado* (MINAG 2000).

Determinación de clorofila, rendimiento total y porcentaje de capas de exportación superior

En el momento de recolección prefijado y siempre en los dos surcos interiores de cada parcela, se seleccionaron ocho plantas al azar para la determinación de clorofila como el promedio de seis mediciones SPAD en cada hoja, tres en el ápice y tres en el centro. Además, se calcularon las medias para cada nivel foliar y entre los niveles foliares de cada la planta.

Por otra parte, el rendimiento total y en clases exportables, se determinó según el *Instructivo para el acopio y beneficio del tabaco negro tapa*do (Valladares, 2003) y se

calcularon los porcentajes de capas de exportación superior respecto al rendimiento total.

Análisis estadísticos

Durante el experimento se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov para una significación del 5%. Se realizó el análisis de varianza paramétrico de clasificación simple a las medias de la clorofila foliar, y al rendimiento total y en capas de exportación. Se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan con una probabilidad de 0,05 para determinar diferencias significativas. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 10.0.5 (SPSS Inc.)

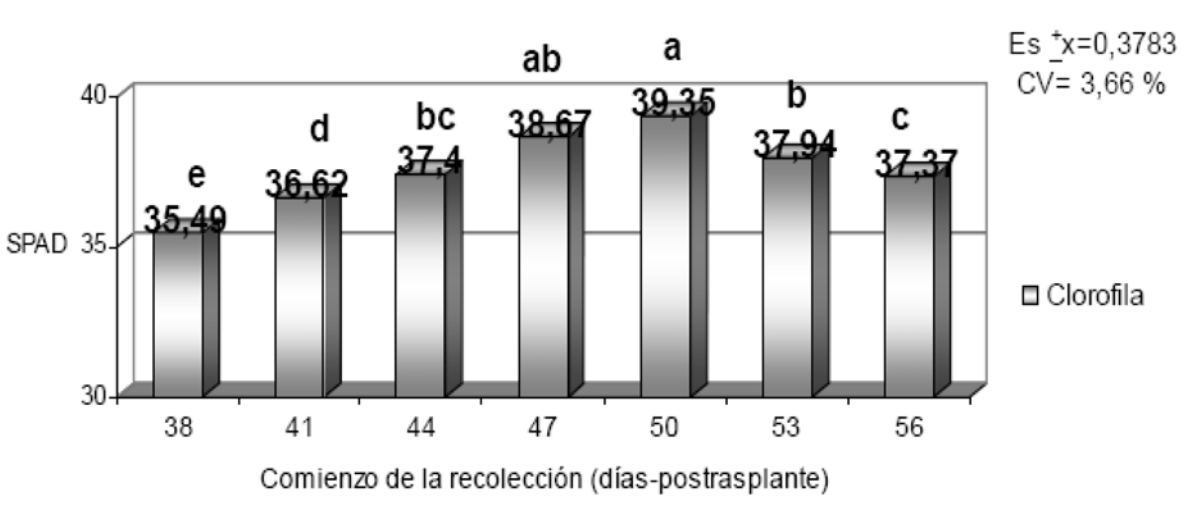
Asimismo, se realizó el análisis de regresión y correlación entre la clorofila foliar para cada nivel foliar y el rendimiento en clases superiores Para ello se utilizó el Programa Estadístico CurveExpert 1.3 (http://www.msstate.edu/~dgh2/cvxpt.htm.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó una disminución de la clorofila SPAD con el retraso de las recolecciones a partir del día 50 (Fig. 1), que resultó el de máximo contenido con 39,5 SPAD. Sin embargo, cuando se inició la recolección a los 53 días, el decrecimiento fue de 1,6 SPAD, lo que significa un 4% respecto al valor del día 50. Con el inicio de la recolección a los 56 días, la reducción fue de 2,2 SPAD, que representa un 5%.

Al respecto Ares (2002) plantea que en la madurez técnica del tabaco negro se produce una reducción del 8% de la clorofila respecto a su máxima concentración. Este resultado indica una disminución menor, ocurrida probablemente, por las diferentes condiciones en las que se realizaron dichas investigaciones y al método utilizado para obtener la clorofila foliar. Hörtensteiner (2006) indica que la pérdida de clorofila es el parámetro más fácil de medir para describir el amarillamiento de las hojas, mientras que Tso (1999) asegura que los componentes nitrogenados de las hojas verdes decrecen con el retraso de la recolección y con ellos el contenido de clorofila.

En la figura 2 se aprecian los rendimientos total y en capas de exportación superiores para cada tratamiento. Ambos se incrementaron con el retardo de la recolección hasta los 53 días y, posteriormente, descendieron. Rodríguez *et al.* (2003) con-



Cada valor es el promedio de todos los niveles foliares.

Fig. 1. Niveles de clorofila foliar expresada en SPAD en cada uno de los momentos de la recolección estudiados.

cuerdan con estas observaciones y explican que las pérdidas en masa seca durante el curado para las hojas inmaduras se reducen al aumentar el tiempo para iniciar la recolección, pues en dichas hojas la fase de amarillamiento se prolonga, las células permanecen vivas por más tiempo y consumen gran cantidad de sus componentes en la respiración.

En la figura 3 se muestra el análisis de regresión y correlación entre la clorofila media para cada nivel foliar y los porcentajes de capas de exportación superior. También se puede observar que se logró una elevada correlación positiva (r = 0,9025) entre ambas variables. Cuando la clorofila foliar superó los 39 SPAD se obtuvieron rendimientos por encima del 17 %, mientras que por debajo de 30 SPAD, no se obtuvieron capas. La clorofila foliar resultó un factor limitante en los porcentajes de capas.

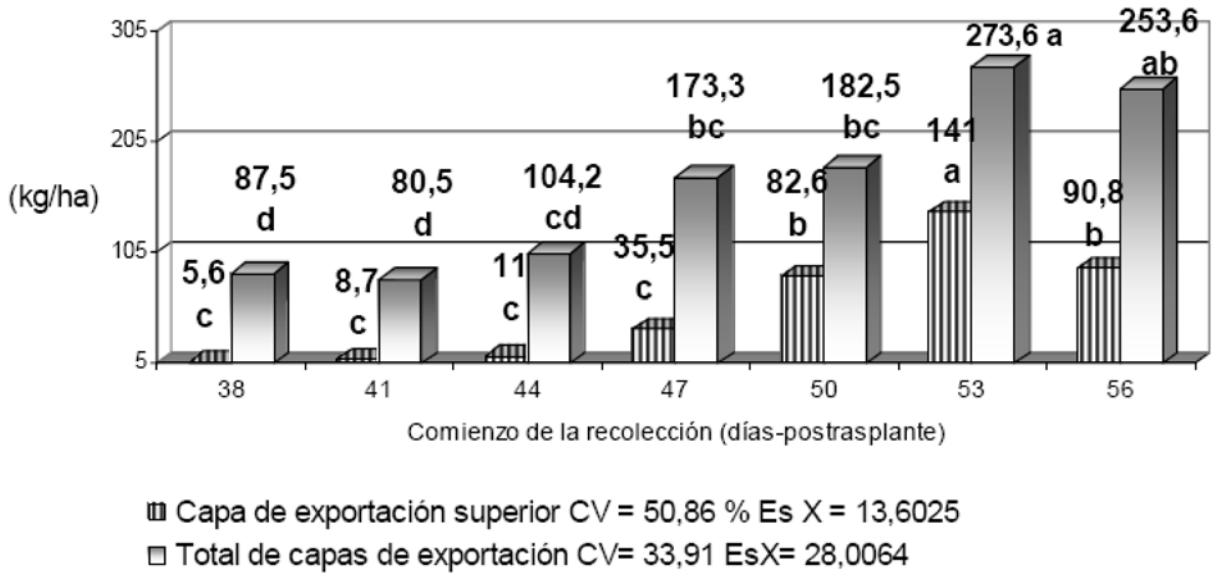


Fig. 2. Rendimiento en capas de exportación superior y total (kg/ha) en relación con el momento de inicio de la recolección de las hojas.

Por otra parte, en las hojas sobremaduras decrece el rendimiento, pues al avanzar la senescencia predominan procesos degradativos de los carbohidratos por el incremento en la respiración, (Flower, 1999). También, se degradan los cloroplastos del mesófilo en los que se encuentra 75% del nitrógeno total de dichas células, que forman parte de las proteínas asociadas a los complejos colectores de luz y la enzima Rubisco. (Hörtensteiner y Feller, 2002).

Algunos investigadores como Ares, (2002) se refieren a cuanto debe disminuir la clorofila en la madurez técnica, pero, hasta el momento, ninguna publicación relacionada con tabaco negro se había referido a un valor por debajo del cual no debería disminuir la clorofila, para una buena producción de capas.

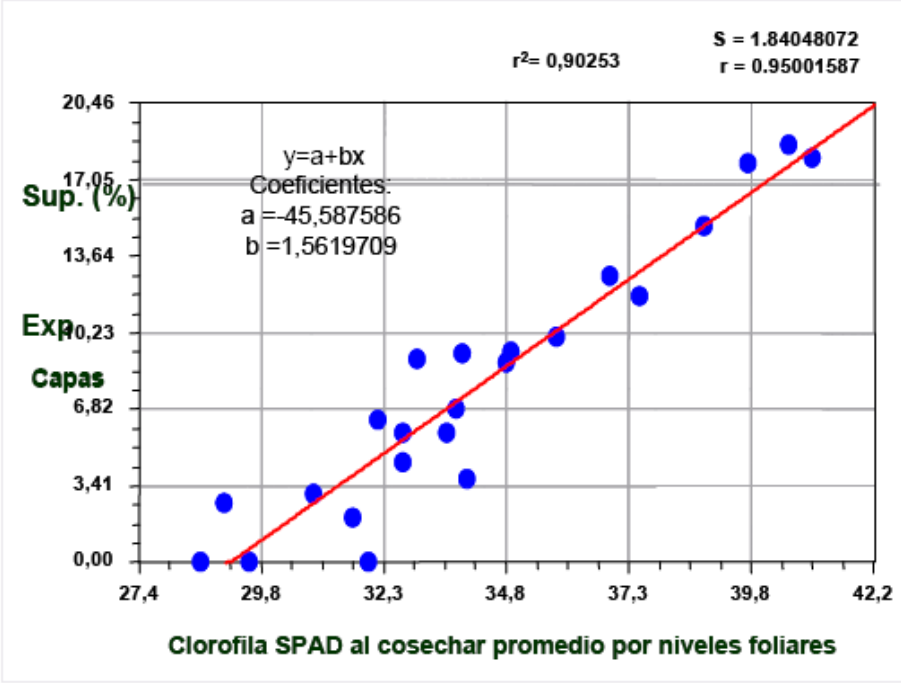


Fig. 3. Relación entre los contenidos de clorofila al cosechar y el porcentaje de capas de

Este estudio reveló que para todos los niveles foliares, solo aquellas hojas cuya clorofila en el momento de la recolección superó los 39 SPAD, pueden lograr un producto de calidad después del curado.

De Roton *et al.* (1997) utilizan el SPAD 502 para medir la intensidad del color verde de hojas cosechadas con diferentes grados de madurez, mientras Mac Kown y Sutton (1998) señalan la correlación entre los valores SPAD y los contenidos de nitrógeno total y clorofila obtenidos por análisis químico foliar en tabaco 'Burley´. Estas investigaciones constituyen antecedentes importantes del uso de los valores SPAD, para la estimación de la madurez técnica y el estado nutricional del tabaco.

Aunque la clorofila foliar disminuye cuando se alcanza la madurez técnica, no debe descender a valores demasiado bajos, lo que se logra con una cosecha en buen estado nutricional. Durante el crecimiento y desarrollo de la planta se deben garantizar altos contenidos de clorofila. (Izquierdo *et al.,* 2007).

CONCLUSIONES

Por primera vez se obtiene en tabaco negro un criterio de mayor exactitud para definir el momento óptimo para recolectar la hoja.

Se define para la variedad 'Corojo-99´ que la clorofila foliar en el momento de la recolección no debe disminuir de 39 SPAD, para alcanzar un alto porcentaje de capas de exportación superior.

REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS

Akehurst, B. C.: *El tabaco,* 682 pp., Ed. Ciencia y Técnica, La Habana, 1973.

Ares, D. M,: Importancia de la bioquímica en los procesos de curación y fermentación, y usos no convencionales del tabaco. En *El tabaco cubano: de los orígenes a la comercialización* (Diplomado), 2002.

De Roton, C., J. Tancogne and R. Bazir:

Effect of maturity on the leaf characteristics of flue cured varieties K326 and ITB 31612. *CORESTA Meet*. *Groupes Agro-Phyto,* Montreux, AP3, 1997.

Flower, K. C.: Agronomy and Physiology: Field Practices. In *Tobacco: Production, chemistry and technology,* pp. 69-103, Ed: Blackwell Science, 1999.

Hernández, A. *et al.: Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba,* 64 pp., Minag, Ciudad de La Habana, 1999.

Hörtensteiner, S.: Chlorophyll degradation during senescence. *Ann. Rev. Plant Biol.,* 57:55-77 2006.

Hörtensteiner, S and U. Feller: Nitrogen metabolism and remabilisation during senescence. *J. Exp. Bot.,* 53(370):927-937, 2002.

Izquierdo, A. M, Betty Hernándezy otros: Logro científico. Influencia de las tecnologías de fertilización sobre los rendimientos, la calidad y las afectaciones por manchas del curado en el tabaco cultivado bajo tela, 2007.

Lawlor, D. W.: Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue. *J. Exp. Bot.,* 53(370):773-787, 2002.

Mac Kown, C. T and T. G Sutton: Using early season leaf traits to predict nitrogen sufficiency of Burley Tobacco. *Agron. J.,* 90:21-27, 1998.

Minag, Ministerio de la Agricultura, Cuba: *Manual técnico para la producción de tabaco negro tapado,* 44 pp., La Habana, 2000.

Monzón, L. H.: Aspectos generales de la maduración de la hoja de tabaco. (*Nicotiana tabacum* L.). *Cuba Tabaco,* 4 (1):56-59, 2003.

Programa Estadístico CurveExpert 1.3: Consultado en (http://www.msstate.edu/~dgh2/cvxpt.htm.), Chile, 2000

Rodríguez, Nidia, Betty Hernández y Yarilis León: Momentos de recolección para la variedad 'Çriollo-98´ cultivada bajo tela en la provincia de Pinar del Río. *Cuba Tabaco,* 4(2):19-23, 2003.

Tso, T. C.: Seeds to smoke. In *Tobacco: production, chemistry and technology,* pp. 1-31, Ed. Blackwell Science, USA, 1999.

Valladares, R. D.: Instructivo para el acopio y beneficio del tabaco negro tapado, 59 pp., Agrinfor, La Habana, 2003.